

1/9/1  
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013727889      \*\*Image available\*\*  
WPI Acc No: 2001-212119/ 200122  
XRAM Acc No: C01-063410

New protease-resistant modified cyclic peptides derived from urokinase type plasminogen activator receptor peptide inhibitor, useful e.g. for tumor treatment and for preparing targeting vehicles

Patent Assignee: WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH (WILE-N); WILEX AG (WILE-N)  
Inventor: BUERGLE M; KESSLER H; POTTHOFF N; SCHMIEDEBERG N; WILHELM O G;  
WILHELM O

Number of Countries: 095    Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19933701	A1	20010125	DE 1033701	A	19990719	200122    B
WO 200105811	A2	20010125	WO 2000EP6905	A	20000719	200122
AU 200064357	A	20010205	AU 200064357	A	20000719	200128
EP 1194531	A2	20020410	EP 2000951406	A	20000719	200232
			WO 2000EP6905	A	20000719	

Priority Applications (No Type Date): DE 1033701 A 19990719

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

DE 19933701	A1	15		C07K-007/64	
-------------	----	----	--	-------------	--

WO 200105811	A2	G		C07K-007/00	
--------------	----	---	--	-------------	--

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA  
CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP  
KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT  
RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR  
IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

AU 200064357	A			C07K-007/00	Based on patent WO 200105811
--------------	---	--	--	-------------	------------------------------

EP 1194531	A2	G		C12N-009/72	Based on patent WO 200105811
------------	----	---	--	-------------	------------------------------

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT  
LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

Abstract (Basic): DE 19933701 A1

NOVELTY - New cyclic peptide compounds (I) are derived from the aminoacids 21-30 region of urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) peptide inhibitor by introduction of isostructural and/or isofunctional natural or non-natural aminoacid residues.

DETAILED DESCRIPTION - Cyclic peptide compounds of formula (I) and their salts and derivatives are new.

X21-X30=monomer units (preferably aminocarboxylic acid residues) giving a product derived from the lead structure (I; X21=D-Cys; X22=Asn; X23=Lys; X24=Tyr; X25=Phe; X26=Ser; X27=Asn; X28=Ile; X29=Cys; X30=Trp) (i.e. cyclo (21,29) (D-Cys21,Cys29)-uPA21-30 (I')), the monomer units being linked via -CON(R1)- or -N(R1)CO- bonds;

Y=spacer;

m=0 or 1;

R1=H, Me or Et;

provided that either:

(1) at least one of the aminoacid residues X21-X30 of (I') is

replaced as follows:

X21=Asp, Glu, 2,3-diaminopropionic acid (Dap), 2,4-diaminobutyric acid (Dab), penicillamine (Pen), D-Pen, allylglycine (Alg), ornithine (Orn) or Lys;

X22=Gln, Asp or Glu;

X23=Orn, Dap, Arg, His, citrulline (Cit), homocitrulline (Hci) or norleucine (Nle);

X24=Phe, homophenylalanine (Hph),  
1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (Tic), thienylalanine (Thi), phenylglycine (Phg), 1-naphthylalanine (1-Nal),  
2-naphthylalanine (2-Nal) or cyclohexylalanine (Cha);

X25=Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph or Phg;

X26=Thr, Val or homoserine (Hse);

X27=Gln, Asp or Glu;

X28=Val, Leu, 2-aminobutyric acid (Abu), tert. lysine (Tle), norvaline (Nva), Nle, alpha-aminoisobutyric acid (Aib) or Cha;

X29=Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn or Lys;

X30=Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, octahydroindolyl-2-carboxylic acid (Oic), His, thiazolylalanine (Thia), Phg or tryptamine;

or (2) at least one of X21-X30 in (I') is replaced by a non-proteinogenic aminoacid.

ACTIVITY - Cytostatic; antiarthritic; antiinflammatory; osteopathic; ophthalmological; antifertility.

MECHANISM OF ACTION - uPAR antagonist.

The 241-Nal derivative of (I') had an IC50 value approximately the same as that of (I'), i.e. ca. 60 nM.

USE - (I) are uPAR antagonists, used for controlling diseases associated with expression of uPAR (especially for tumor treatment) and for the preparation of a targeting vehicle for uPAR-expressing cells (all claimed). uPAR antagonists in general are also useful for treating arthritis, inflammation, osteoporosis or retinopathy and for contraception. In targeting applications (I) are useful for preparing vehicles (e.g. liposomes or viral vectors) for targeting uPAR-expressing cells for diagnostic purposes (e.g. for controlled transport of radioactive or other labeling groups) or therapeutic purposes (e.g. for controlled transport of drugs, such as nucleic acids for gene therapy).

ADVANTAGE - (I) have improved affinity for uPAR, increased stability to proteases (especially towards physiological proteases in blood, tissue or the digestive tract, e.g. plasmin, pepsin, trypsin or chymotrypsin) and/or improved therapeutic action compared with (I'). Typically substitution of 23Lys of (I') by non-proteinogenic aminoacids markedly increases the stability towards plasmin without significantly reducing the biological activity. In tests for stability in human serum, after incubation in serum at 37degreesC for 20.5 hours the concentration of cyclo (21,29) (D-Cys21,Tic25,Cys29)-uPA21-30 remained almost unchanged, whereas cyclo (19,30)-uPA16-32 was degraded completely under these conditions.

pp; 15 DwgNo 0/5

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - ORGANIC CHEMISTRY - Preparation: (I) can be prepared by solid phase synthesis.

Title Terms: NEW; PROTEASE; RESISTANCE; MODIFIED; CYCLIC; DERIVATIVE;  
UROKINASE; TYPE; PLASMINOGEN; ACTIVATE; RECEPTOR; PEPTIDE; INHIBIT;  
USEFUL; TUMOUR; TREAT; PREPARATION; VEHICLE

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-007/00; C07K-007/64; C12N-009/72

International Patent Class (Additional): A61K-038/12; A61K-038/49;  
A61P-035/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01B; B04-E01; B12-K04A; B12-K04B; B14-C03;  
B14-C09; B14-H01; B14-L06; B14-N01; B14-N03; B14-P01; B14-S03

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* D011 D013 D601 D632 G013 G100 H1 H101 H182 H2 H211 H4 H402 H441 H481  
H498 H8 H9 J0 J014 J1 J171 J3 J311 J373 M280 M312 M315 M322 M323  
M332 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M392 M393 M423 M512 M520  
M531 M540 M710 M904 M905 P420 P421 P633 P714 P831 P843 P922 RA3MD3-T  
RA3MD3-N

\*02\* D011 D013 D015 D016 D019 D601 D602 D699 E290 E350 E530 E570 E860  
E880 E910 E920 F011 F012 F013 F014 F015 F016 F017 F019 F211 F299  
F521 F590 F599 F660 F710 F750 F760 G010 G013 G019 G020 G021 G029  
G030 G100 G111 G112 G221 G299 G563 H1 H100 H101 H121 H181 H211 H212  
H213 H401 H402 H403 H404 H441 H442 H443 H481 J0 J013 J171 J172 J3  
J311 J371 J372 J411 J471 J5 J523 J581 L250 L432 L9 L941 L942 L943  
L980 L999 M113 M119 M123 M125 M126 M129 M132 M135 M139 M210 M211  
M212 M213 M214 M231 M232 M233 M240 M273 M281 M282 M283 M311 M312  
M313 M314 M321 M322 M323 M331 M332 M340 M342 M343 M349 M371 M372  
M373 M391 M392 M393 M412 M413 M423 M510 M511 M512 M513 M520 M521  
M522 M523 M530 M531 M532 M533 M540 M541 M630 M640 M650 M710 M904  
M905 P420 P421 P633 P714 P831 P843 P922 0036-12701-T 0036-12701-N  
65072



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 33 701 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 K 7/64**  
A 61 K 38/12

⑦1 Aktenzeichen: 199 33 701.2  
②2 Anmeldetag: 19. 7. 1999  
④3 Offenlegungstag: 25. 1. 2001

DE 199 33 701 A 1

⑦1 Anmelder:  
Wilex Biotechnology GmbH, 81675 München, DE  
  
⑦4 Vertreter:  
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦2 Erfinder:  
Wilhelm, Olaf G., 81545 München, DE; Kessler,  
Horst, Dipl.-Chem., 85748 Garching, DE; Bürgle,  
Markus, Dipl.-Chem., 81369 München, DE; Potthoff,  
Nils, Dipl.-Ing. (FH), 85221 Dachau, DE;  
Schmiedeberg, Niko, 81679 München, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ⑤4 Zyklische peptidomimetische Urokinaserezeptorantagonisten  
⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft zyklische Peptide als  
Inhibitoren für die Bindung von Urokinase an den Uroki-  
naserezeptor. Diese zyklischen Peptide sind als pharma-  
zeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet, die durch  
Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden.

DE 199 33 701 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft zyklische Peptide als Inhibitoren der Bindung von Urokinase an den Urokinaserezeptor, die als pharmazeutische Wirkstoffe für Krankheiten geeignet sind, die durch Urokinase und ihren Rezeptor vermittelt werden. Die erfindungsgemäßen Substanzen sind von der uPA-Sequenz abgeleitete Peptide und entfalten als Liganden des Urokinaserezeptors (uPAR) eine antagonistische Wirkung, und werden im folgenden als uPAR-Antagonisten bezeichnet.

Die Serinprotease uPA (Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator) ist für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse verantwortlich, wie etwa den proteolytischen Abbau von extrazellulärem Matrixmaterial, das für die Invasivität und Wanderung von Zellen sowie für die Geweberemodellierung notwendig ist. uPA bindet mit hoher Affinität ( $K_D = 10^{-10}$ – $10^{-9}$ M) an den membranständigen uPA Rezeptor (uPAR) auf der Zelloberfläche.

Die Bindung von uPA an seinen Rezeptor ist an vielen invasiven biologischen Prozessen wie etwa der Metastasierung bösartiger Tumoren, der Trophoplastenimplantation, Entzündungen und Angiogenese beteiligt. Daher sind Antagonisten von uPAR in der Lage, die Invasivität, Metastasierung und Angiogenese von Tumoren zu hemmen, uPAR-Antagonisten können als Mittel zur Therapie invasiver und metastasierender Krebserkrankungen eingesetzt werden, bei denen uPA und uPAR an den invasiven Foci von Tumoren auftreten (Dano et al.: The receptor for urokinase plasminogen activator: Stromal cell involvement in extracellular proteolysis during cancer invasion, in: Proteolysis and Protein Turnover, Barrett, A. J. und Bond, J., HRSG, Portland Press, London, 1994, 239), z. B. bei Krebserkrankungen von Brust, Lunge, Darm und Ovarien. Darüber hinaus können uPAR-Antagonisten auch für andere Zwecke eingesetzt werden, bei denen eine Hemmung der proteolytischen Aktivierung von Plasminogen erforderlich ist, beispielsweise zur Bekämpfung von Krankheiten wie Arthritis, Entzündungen, Osteoporose, Retinopathien und zur Kontrazeption.

Der uPA Rezeptor ist in WO 90/ 12091 sowie in den Veröffentlichungen Ploug et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 17539 und Ronne et al., J. Immunol. Methods 167 (1994), 91 beschrieben.

uPA wird als einzelkettiges Molekül (pro-uPA) synthetisiert und enzymatisch in einen aktiven zweikettigen uPA überführt. Das uPA Molekül besteht aus drei strukturell unabhängigen Domänen, der N-terminal lokalisierten wachstumsfaktorartigen Domäne (GFD, uPA 1–46), einer Kringelstrukturdomäne (uPA 45–135) und der Serinproteasedomäne (uPA 159–411). GFD und die Kringeldomäne bilden zusammen das sogenannte aminoterminal Fragment von uPA (ATF, uPA 1–135), das durch weitere proteolytische Spaltung von zweikettigem uPA erzeugt wird. ATF bindet an den uPA Rezeptor mit einer ähnlichen Affinität wie uPA.

Die receptorbindende Region von uPA erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 12 bis 32, da ein Peptid, welches die Aminosäurereste 12 bis 32 von uPA enthält (wobei Cystein an Position 19 durch Alanin ersetzt ist) mit ATF um die Bindung an den uPA Rezeptor kompetiert (Appella et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 4437–4440). Weiterhin wurde dort gezeigt, daß dieses Peptid auch nach Zyklisierung durch Verbrückung der beiden Cysteinreste an den Positionen 12 und 32 eine Affinität für den uPA Rezeptor zeigt. In einem alternativen Ansatz wurden von Goodson et al., (Proc. Natl. Acad. USA 91 (1994), 7129–7133) antagonistische uPA-Peptide für den uPAR mittels Musterung einer Bakteriophagen-Peptidbibliothek identifiziert. Diese Peptide zeigten keine ersichtliche Sequenzhomologie zu der natürlichen uPAR-bindenden Sequenz von uPA.

In neueren Veröffentlichungen (Rettenberger et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (1995), 587–594; Magdolen et al., Eur. J. Biochem. 237 (1996), 743–751; Goretzki et al., Fibrinolysis and Proteolysis 11 (1997), 11–19) sind weitere Untersuchungen an der uPAR-Bindungsregion des uPA beschrieben. Dabei wurden die Reste Cys19, Lys23, Tyr24, Phe25, Ile28, Trp30 und Cys31 als wichtige Determinanten für eine uPA/uPAR-Wechselwirkung identifiziert. Als wirksamster Inhibitor wurde in diesen Untersuchungen ein uPA-Peptid mit den Aminosäuren 16 bis 32 von uPA identifiziert.

Magdolen et al. (1996) supra, analysieren die uPAR-Bindungsregion des uPA-Moleküls unter der Verwendung eines Peptids mit den Aminosäuren 14 bis 32 von uPA und davon abgeleiteten Peptiden. Diese sowie auch die von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Peptide (vgl. z. B. Appella et al. (1987) supra) weisen jedoch eine relativ geringe Affinität zum uPAR auf.

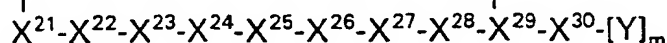
WO-A-94/22646 offenbart lineare Peptide mit einer Länge von 6 bis 18 Aminosäuren, die aus dem Bereich der Aminosäuren 14 bis 33 von uPA stammen. Es wird beschrieben, daß kurze von uPA abgeleitete Peptide (uPA 21–29 und uPA 21–26) in der Lage sind, das Wachstum von Keratinozyten zu beeinflussen. Zwar wird in WO-A-94/22646 auf einen möglichen Einsatz der beanspruchten Peptide für die Blockierung der uPA/uPAR-Wechselwirkung hingewiesen, es werden jedoch keinerlei Daten oder Hinweise auf derartige Bindungsstudien gezeigt. Darüber hinaus enthalten die als bevorzugt genannten linearen Peptide uPA 21–29 und uPA 21–26 nicht die minimale uPAR-Bindungsregion von linearen uPA-Peptiden, welche den Sequenzbereich der Aminosäuren 19 bis 31 umfaßt. Die Beeinflussung des Wachstums von Keratinozyten durch diese kurzen Peptide beruht somit sehr wahrscheinlich nicht auf einer uPA/uPAR-Wechselwirkung.

WO 98/46632 offenbart uPAR-Peptidinhibitoren, die vom linearen Peptid uPA (19–31) und zyklischen Derivaten davon abgeleitet sind und an ausgewählten Positionen D-Aminosäurereste tragen.

Ein Beispiel für einen solchen Peptidinhibitor ist das Peptid cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21–30</sub>. Dieses Peptid besitzt eine bereits recht hohe Affinität für uPAR ( $IC_{50} = 78$  nM), die nur noch um einen Faktor 4 geringer als die Affinität des aminoterminalen Fragments von uPA (ATF = Aminosäuren 1–135 der Urokinase) mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 21 nM ist. Das entsprechende ausschließlich aus L-Aminosäuren zusammengesetzte Peptid cyclo[(21,29)-[Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21–30</sub>] hat eine hundertfach geringe Aktivität im Vergleich zu ATF.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, durch Einbau isostruktureller oder/und isofunktioneller natürlicher bzw. nichtnatürlicher Aminosäuren die Struktur des uPAR-Peptidinhibitors zu modifizieren und somit eine weitere Verbesserung hinsichtlich der Affinität für uPAR, der Serumstabilität oder/und der therapeutischen Wirkung zu erreichen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin

$X^{21}$ - $X^{30}$  monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung  $X^{21}$  = D-Cys,  $X^{22}$  = Asn,  $X^{23}$  = Lys,  $X^{24}$  = Tyr,  $X^{25}$  = Phe,  $X^{26}$  = Ser,  $X^{27}$  = Asn,  $X^{28}$  = Ile,  $X^{29}$  = Cys und  $X^{30}$  = Trp abgeleitet sind,

Y ein Spacer ist und m 0 oder 1 ist, und

die monomeren Bausteine über -CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur durch einen der im folgenden angegebene Aminosäurereste ersetzt ist:

$X^{21}$ : Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diaminobuttersäure (Dab), Penicillanin (Pen), D-Pen, Allylglycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;

$X^{22}$ : Gln, Asp, Glu;

$X^{23}$ : Orn, Dap, Arg, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);

$X^{24}$ : Phe, Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal), Cha (Cyclohexylalanin);

$X^{25}$ : Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;

$X^{26}$ : Thr, Val, Homoserin (Hse);

$X^{27}$ : Gln, Asp, Glu;

$X^{28}$ : Val, Leu, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tle), Norvalin (Nva), Nle,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib), Cha;

$X^{29}$ : Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn, Lys;

$X^{30}$ : Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, Octahydroindolyl-2-carbonsäure (Oic), His, Thiazolylalanin (Thia), Phg, Tryptamin.

Bevorzugt sind Peptide, bei denen mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur einer der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

$X^{21}$ : D-Pen;

$X^{22}$ : Gln;

$X^{23}$ : Orn, Dap, Dab, Arg, Cit, Hci, Nle, His;

$X^{24}$ : Phe, Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

$X^{25}$ : Thi;

$X^{27}$ : Asp;

$X^{28}$ : Nle, Val, Cha;

$X^{29}$ : Pen;

$X^{30}$ : Phe, Thi, Tyr, Oic, 1-Nal, Hph, Thia.

Besonders bevorzugt sind Peptide, in denen mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur einer der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

$X^{21}$ : D-Pen;

$X^{23}$ : Arg, Nle, Cit, Hci;

$X^{24}$ : Phe, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

$X^{25}$ : Thi;

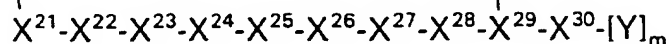
$X^{28}$ : Nle, Cha;

$X^{29}$ : Pen.

Y ist eine Spacergruppe, z. B. eine aus einer oder mehreren Aminosäuren aufgebaute peptidische Spacergruppe, z. B. Poly-Lys, oder eine andere Spacergruppe, z. B. eine Polyethylenglykolgruppe. Das Peptid kann über die Gruppe Y an Trägersubstanzen gekoppelt werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide sind zyklische Peptide mit einem neungliedrigen Ring, wobei mindestens 2, vorzugsweise mindestens 3 und besonders bevorzugt mindestens 4 der den Ring bildenden Aminosäurereste eine Sequenz aus der uPA-Region 22 bis 28 aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin

$X^{21}$ - $X^{30}$  monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung  $X^{21}$  = D-Cys,  $X^{22}$  = Asn,  $X^{23}$  = Lys,  $X^{24}$  = Tyr,  $X^{25}$  = Phe,  $X^{26}$  = Ser,  $X^{27}$  = Asn,  $X^{28}$  = Ile,  $X^{29}$  = Cys und  $X^{30}$  = Trp abgeleitet sind,

Y ein Spacer ist und m 0 oder 1 ist, und

die monomeren Bausteine über -CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon,

mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur durch einen nicht-proteinogenen Aminosäurerest ersetzt ist, wobei die resultierenden Verbindungen vorzugsweise eine erhöhte Proteasestabilität, insbesondere eine erhöhte Stabilität gegenüber physiologischen Proteasen, z. B. im Blut oder Gewebe vorkommenden Proteasen, wie etwa Plasmin oder/und im Verdauungstrakt vorkommenden Proteasen wie etwa Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin im Vergleich zur Leitstruktur aufweisen. Vorzugsweise ist zumindest der Aminosäurerest Lys<sup>23</sup> durch eine nicht-proteinogene Aminosäure, d. h. durch eine nicht genetisch kodierte Aminosäure wie etwa Orn, Dap, Dab, Cit, Hci oder

Nie ersetzt.

Neben Peptiden der Strukturformel (I) sind auch pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon als uPAR-Antagonisten geeignet. Als Derivate kommen dabei insbesondere solche Verbindungen in Betracht, die an reaktiven Gruppen der Seitenkette oder/und des N- bzw. C-Terminus, z. B. an Amino- oder Carbonsäuregruppen, modifiziert sind.

- 5 Beispiele für solche Modifikationen sind eine Acylierung, z. B. eine Acetylierung von Aminogruppen oder/und eine Amidierung oder Veresterung von Carbonsäuregruppen.

Die monomeren Bausteine sind über Säureamidbindungen  $\text{NR}^1\text{CO}$  oder  $\text{CONR}^1$  verknüpft, d. h. die Peptidsequenzrichtung kann umgekehrt werden (Retlopeptide).  $\text{R}^1$  kann wie in nativen Polypeptiden Wasserstoff bedeuten. Andererseits kann  $\text{R}^1$  jedoch auch einen Alkylrest, z. B. Methyl oder Ethyl, und insbesondere Methyl bedeuten, da durch eine N-Alkylierung der Amidbindung oftmals eine starke Aktivitätsbeeinflussung bewirkt werden kann (vgl. z. B. Levian-Teilbaum et al., Biopolymers 28 (1989), 51-64). Als monomere Bausteine werden die  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren – sofern nicht anders angegeben – in Form von L-Enantiomeren eingesetzt.

- 10 Die erfindungsgemäßen Peptide sind zyklische Verbindungen, wobei die monomeren Bausteine  $\text{X}^{21}$  und  $\text{X}^{29}$  miteinander verbrückt sind. Diese Verbrückung kann beispielsweise über die Seitenketten der jeweiligen  $\alpha$ -Aminocarbonsäurereste erfolgen, wobei eine Verbrückung über Disulfidbindungen, z. B. zwischen zwei Cysteinresten besonders bevorzugt ist. Andere Arten der Zyklisierung zwischen Aminosäureseitenketten sind jedoch auch möglich, z. B. Amidbindungen zwischen einer Aminosäure mit einer Amino-seitengruppe, z. B. Ornithin oder Lys und einer Aminosäure mit einer Carbonsäure-seitengruppe wie etwa Asp oder Glu. Weiterhin kann die Disulfidbrücke auch durch eine Alkylen-Brücke ersetzt werden, um die chemische Stabilität zu erhöhen. Darüber hinaus sind auch Verknüpfungen von einer Aminosäure-seitenkette mit dem Peptidrückgrat, z. B. Verknüpfung einer Amino-seitengruppe, z. B. einer  $\omega$ -Amino-seitengruppe, mit dem C-terminalen Ende bzw. Verknüpfung einer Carbonsäure-seitengruppe mit dem N-terminalen Ende möglich. Auch eine Verknüpfung von N- und C-Terminus ist möglich. Die erfindungsgemäßen Peptide sind durch chemische Synthese wie in den Beispielen erläutert erhältlich.

- 15 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens ein Peptid oder Polypeptid wie zuvor definiert gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält. Insbesondere werden die erfindungsgemäßen Peptide oder Polypeptide zur Herstellung von uPAR-Antagonisten verwendet, die sich auch zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung eignen.

- 20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen uPAR-Peptidantagonisten zur Herstellung von Targetingvehikeln, z. B. Liposomen, viralen Vektoren etc., für uPAR-exprimierende Zellen. Das Targeting kann für diagnostische Anwendungen zum gesteuerten Transport von Markierungsgruppen, z. B. radioaktiven oder nichtradioaktiven Markierungsgruppen erfolgen. Andererseits kann das Targeting für therapeutische Anwendungen, z. B. zum Transport von pharmazeutischen Wirkstoffen, beispielsweise auch zum Transport von Nukleinsäuren für die Gentherapie erfolgen.

- 25 Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können in beliebiger Form vorliegen, beispielsweise als Tabletten, als beschichtete Tabletten oder in Form von Lösungen oder Suspensionen in wässrigen oder nichtwässrigen Lösungsmitteln. Die Peptide werden vorzugsweise oral oder parenteral in einer flüssigen oder festen Form verabreicht. Bei Verabreichung in flüssiger Form wird Wasser vorzugsweise als Trägermedium verwendet, das gegebenenfalls Stabilisatoren, Löslichkeitsvermittler oder/und Puffer enthält, die üblicherweise für Injektionslösungen verwendet werden. Solche Zusatzstoffe sind beispielsweise Tartrat- oder Boratpuffer, Ethanol, Dimethylsulfoxid, Komplexierungsmittel wie etwa EDTA, Polymere wie etwa flüssiges Polyethylenoxid, etc.

- 30 Bei Verabreichung in fester Form können feste Trägersubstanzen wie etwa Stärke, Lactose, Mannitol, Methylcellulose, Talkum, hochdisperses Siliciumoxid, hochmolekulare Fettsäuren wie etwa Stearinsäure, Gelatine, Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette oder feste hochmolekulare Polymere wie etwa Polyethylenglykole eingesetzt werden. Weiterhin können die Formulierungen zu oralen Applikation sofern gewünscht auch Aromastoffe und Süßstoffe enthalten.

- 35 Die erfindungsgemäßen therapeutischen Zusammensetzungen können auch in Form von Komplexen vorliegen, z. B. mit Cyclodextrinen wie etwa  $\gamma$ -Cyclodextrin. Die verabreichte Dosis hängt vom Alter, Gesundheitszustand und Gewicht des Patienten, von der Art und der Schwere der Erkrankung, von der Art der Behandlung, von der Häufigkeit der Verabreichung und der Art der gewünschten Wirkung ab. Die tägliche Dosis der aktiven Verbindung ist üblicherweise 0,1 bis 50 mg/Kilogramm Körpergewicht. Normalerweise sind 0,5 bis 40 und vorzugsweise 1,0 bis 20 mg/kg/Tag in einer oder mehreren Dosen ausreichend, um die gewünschten Wirkungen zu erreichen.

Weiterhin soll die Erfindung durch die im Nachfolgenden beschriebenen Beispiele und Figuren erläutert werden.

Es zeigen:

- 40 55 **Fig. 1** den Vergleich der Affinität der Peptide  $\text{cyclo}[21,29][\text{Cys}^{21,29}\text{-uPA}_{21-30}]$  und  $\text{cyclo}[21-29][\text{D-Cys}^{21},\text{Cys}^{29}\text{-uPA}_{21-30}]$ ;

**Fig. 2**  $\text{IC}_{50}$ -Werte von Modifikationen der Leitstruktur  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21},\text{Cys}^{29}\text{-uPA}_{21-30}]$ ;

**Fig. 3** eine schematische Darstellung für bevorzugte Modifikationen der Leitstruktur;

**Fig. 4** die Stabilität der Peptide  $\text{cyclo}[19,31]\text{-uPA}_{16-32}$ .

- 60 **Fig. 5** die Stabilität der Peptide  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21},\text{Tic}^{25},\text{Cys}^{29}\text{-uPA}_{21-30}]$  und  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21},\text{Cys}^{29}\text{-uPA}_{21-30}]$  in Humanserum (a) und heparinisiertem Humanblut (b);

**Fig. 5** die Plasmin-Resistenz von uPA-Peptiden nach Substitution von  $\text{Lys}^{23}$  durch nicht-proteinogene Aminosäuren.

## Beispiele

## 1. Methoden

## 1.1 Festphasenpeptidsynthese

Lineare Peptide wurden auf einem 2-Chlortriethylharz (Barlos et al., *Int. J. Pept. Protein Res.* 37 (1991), 513 bis 520) oder einem Triethylchlorid-Polystyrolharz unter Verwendung eines Applied Biosystems Modell 431 A Peptidsynthesizers bzw. eines multiplen Peptidsynthesizers Modell Syro II (MultiSynTech) synthetisiert. Unter Anwendung der orthogonalen Fmoc-Strategie (Carpino und Han, *J. Org. Chem.* 37 (1972), 3404-3409; Fields und Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* 35 (1990), 161-214) wurden die Aminosäureseitenketten mit den Schutzgruppen Trityl (Asn, Cys, Gln und His), tert.-Butyloxycarbonyl (Lys und Trp), tert.-Butyl (Asp, Glu, Ser, Thr und Tyr), Acetamidomethyl (Cys) und 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl oder 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Arg) blockiert. Die Kuppelung erfolgte bei Raumtemperatur in Dimethylformamid unter Verwendung eines dreifachen Überschusses von 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat/1-Hydroxybenzotriazol/Fmoc-Aminosäure mit 2,5 Äquivalenten von N-Ethyl-diisopropylamin in N-Methylpyrrolidon. Die Fmoc-Gruppe wurde durch sequentielle Behandlung der Harze mit einem Überschuß von 40% bzw. 20% Piperidin in Dimethylformamid entfernt. Die Abspaltung der Peptide und die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen wurde gleichzeitig durch Behandlung mit 93% Trifluoressigsäure/5% Triisopropylsilan/3% H<sub>2</sub>O (0°C/1 h; Raumtemperatur/1 h) durchgeführt. Im Fall von mit 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-geschützten Arg-Gruppen wurden die Peptide für zusätzliche 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die rohen Peptide wurden mit Diethylether bei -30°C präzipitiert, in Methanol gelöst, wie zuvor präzipitiert, in tert.-Butanol gelöst und lyophilisiert. Tryptophan enthaltende Peptide wurden zusätzlich mit 5% Essigsäure für 2 h vor der Lyophilisierung behandelt.

Die Peptide wurden durch HPLC unter Verwendung einer Reverse Phase C-18 Säule (Nucleosil 1005-C18) oder einer YMC-Pack ODS Säule gereinigt. Die Zyklisierung erfolgte durch eine Disulfidbrückenbildung. Die hierzu erforderliche Oxidation wurde durch Aufnehmen von 0,1 bis 0,3 mg/ml der gereinigten linearen Peptide in 80% Wasser und 20% DMSO (Vol/Vol) und Entfernen des Lösungsmittels unter verringertem Druck nach 10 h durchgeführt. Die zyklischen Peptide wurden erneut durch HPLC wie zuvor beschrieben gereinigt.

## 1.2 Massenspektroskopie und Aminosäureanalyse

Die gereinigten und entsalzten Peptide wurden auf dem HPLC-System 140 B (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die UV-Absorption wurde mit einem UVIS 200 Detektor (Linear Instruments, Reno, USA) bei 206 nm gemessen. Die Chromatographie erfolgte auf einer Aquapore 3 µ (Applied Biosystems, Foster City, USA) Reverse Phase Säule (1 mm × 50 mm) mit einer Durchflußrate von 20 µl/min. Das Lösungsmittelsystem war 0,1% TFA in Wasser (A) und 0,1% TFA in Acetonitril (B). Das HPLC System war an eine Atmosphärendruck-Ionisationsquelle gekoppelt, die an ein Tandem-Quadrupolinstrument API III (Sciex, Perkin Elmer, Thornhill, Kanada) angeschlossen war.

Die Quadrupol M/Z-Skala wurde mit den Ammoniumadduktionen von Polypropylen glykol kalibriert. Die durchschnittlichen Massenwerte wurden von den M/Z-Peaks in den Ladungsverteilungsprofilen der mehrfach geladenen Ionen berechnet (Covey et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2 (1988), 249-256; Fenn et al., *Science* 246 (1989), 64-71).

Die Aminosäureanalyse wurde nach der Ninhydrinmethode unter Verwendung des Analysesystems 6300 (Beckman Instruments, Fullerton, USA) nach Hydrolyse der Peptide durch die TFA-HCl-Dampfphasenmethode (Tsugita et al., *J. Biochem.* 102 (1987), 1593-1597) durchgeführt, die eine quantitative Bestimmung der Peptidkonzentration erlaubt.

## 1.3 Durchflußzytometrie

Die Kapazität der synthetischen Peptide zu Hemmung der uPA/uPAR-Wechselwirkung wurde mittels Durchflußzytometrie an dem FACScan Durchflußzytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der humanen Promyeloidzelllinie U937 als Quelle für zellulären nativen uPAR bestimmt (Chuchulowski et al., *Fibrinolysis* 6, Suppl. 4 (1992), 95-102; Magdolen et al., (1996), supra). Die U937 Zellen wurden mit 1 mM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 h stimuliert. Nach Stimulierung mit PMA exprimieren die U937-Zellen beträchtliche Mengen an zelloberflächenassoziiertem uPAR.

Die stimulierten Zellen wurden mit 50 mM Glycin-HCl, 0,1 NaCl, pH 3,6 für 1 min bei Raumtemperatur behandelt, um endogenen rezeptorgebundenen uPA zu dissoziieren. Anschließend wurde der saure Puffer durch 0,5 M HEPES-100 mM NaCl, pH 7,5 neutralisiert. Die Zellen wurden dann sofort zweimal mit PBS/0,1% Rinderserumalbumin (RSA) gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur und 300 × g zentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS/0,1% RSA resuspendiert, auf eine Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen pro ml eingestellt und simultan mit 16 ng FITC-konjugiertem pro-uPA und unterschiedlichen Mengen der synthetischen Peptide für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Analyse wurde Propidiumiodid, ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet, zu jeder Probe gegeben, um die Lebensfähigkeit der analysierten U937 Zellen zu bestimmen. Die beschädigten, Propidiumiodid-markierten Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

## 1.4 Festphasen uPAR/uPA-Bindetest

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Analysen wurde ein Festphasen ATF-Ligandenbindetest zur Untersuchung der Wechselwirkungen von synthetischen Peptiden mit uPAR durchgeführt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit rekombinantem humanem uPAR aus CHO Zellen (Wilhelm et al., *FEBS Lett.* 337 (1994), 131-134; Magdolen et al., *Electrophoresis* 16 (1995), 813-816) beschichtet und die restlichen proteinbindenden Stellen mit 2% RSA (Gew/Vol) abgesät-



tigt. Nach Inkubation mit den Proben (0,6 ng ATF zusammen mit 15 µg synthetisches Peptid pro ml) und mehrfachen Waschschritten wurde die Menge an ATF, die an den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten uPAR gebunden hatte, unter Verwendung eines biotinylierten monoklonalen Mausantikörpers gegen die Kringeldomäne von ATF (Nr. 377, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) und anschließender Zugabe von Avidin-Peroxidase-Konjugat und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat für die Peroxidase bestimmt. Das Vorhandensein von synthetischen Peptiden, die mit der ATF-Bindung an uPAR konkurrieren, verringert den Umsatz des chromogenen Substrats.

### 1.5 Bestimmung der Stabilität von Peptiden in Körperflüssigkeiten

Die Stabilität von uPA-abgeleiteten Peptiden in humanem Serum oder Vollblut wurde *in vitro* getestet.

Für die Präparation von Humanserum wurde venöses Blut ohne Antikoagulans in Polypropylen-Röhrchen bei 37°C 45 min gerinnen gelassen. An der Gefäßwand anhaftende Gerinnsel wurden mit einem Plastikstäbchen abgelöst und bei 1200 × g 12 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abgenommen und entweder frisch für Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt oder aliquotiert bei -20°C zur späteren Verwendung eingefroren.

Für Stabilitätsuntersuchungen in humanem Vollblut wurde venöses Blut durch Heparin-Natrium (1000 I.E. je 10 ml Vollblut) gerinnungsgehemmt und frisch verwendet. Die zu prüfenden Peptide wurden in Form von Peptidgemisch-Stammlösungen (≥ 1 µg je Peptid in H<sub>2</sub>O) den Körperflüssigkeiten in einer Konzentration von 5 µg/100 µl Serum bzw. 200 µl Vollblut (je Peptid) zugefügt und für verschiedene Zeiten bei 37°C inkubiert. Vor der Analyse durch HPLC wurden Vollblutinkubationen 5 min bei Raumtemperatur 16.000 × g zentrifugiert und das überstehende Plasma abgenommen.

Seren und Plasmen wurden vor der HPLC-Analytik über HLB-Vorsäulen (Waters GmbH, Oasis HLB extraction cartridge 1 cm<sup>3</sup>/30 mg) vorgereinigt. Dazu wurden 100 µl der Flüssigkeiten mit PBS auf 1 ml verdünnt und auf die mit 1 ml 100% Methanol und 1 ml H<sub>2</sub>O konditionierte HLB-Vorsäulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit 1 ml 5% Methanol in H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 1 ml 100% Methanol eluiert. Von dem Eluat wurden die ersten 200 µl (4 Tropfen) als Totvolumen verworfen. Die folgenden 500 µl Eluat wurden mit 500 µl PBS verdünnt und HPLC analysiert. Die restlichen 300 µl des Eluats wurden verworfen. Die HPLC-Analytik wurde durchgeführt mit einer YMC-5 C<sub>18</sub> analytischen Säule und einem 20–60% Gradienten aus H<sub>2</sub>O, 0,1% Trifluoressigsäure und Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure über 30 min und Detektion der Analyten bei 220 nm.

### 1.6 Bestimmung der Protease-Resistenz

Die Empfindlichkeit von Peptiden gegen den Angriff verschiedener Proteasen des Verdauungstrakts wurde mit gereinigten Enzymen unter geeigneten Pufferbedingungen *in vitro* durchgeführt. Generell wurden 10 µg Peptid in einem Volumen von 100 µl 30 min bei 37°C mit 2 µg Protease unter den vom Hersteller für die Aktivitätskontrollen angegebenen Pufferbedingungen inkubiert. Nach Inkubation wurden die Ansätze nach Verdünnung mit 300 µl H<sub>2</sub>O ohne Vorreinigung über eine Vorsäule direkt durch HPLC mit einem 20–60% Gradienten aus H<sub>2</sub>O, 0,1% Trifluoressigsäure und Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure analysiert.

Pepsin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde mit Peptiden in 52 mM HCl inkubiert. Inkubationen mit Trypsin (Sigma) wurde in 63 mM Natriumphosphat pH 7,6 durchgeführt. Chymotrypsine α, β, γ, δ (ICN) wurden in 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 40 mM Tris/Cl pH 7,8 inkubiert. Mit bakterieller Proteinase K wurde in ungepuffertem Wasser inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das Peptid cyclo[19,31]-uPA<sub>16–32</sub>, das mit Ausnahme der Cysteinverbrückung der Originalsequenz des uPA-Omega-Loops entspricht, eingesetzt. Die Empfindlichkeit von Peptiden gegen die Gewebeprotease Plasmin (Sigma) wurde in Ansätzen mit 10 oder 5 µg Peptiden und 0,05 U Plasmin in 100 µl 200 mM Natriumphosphat pH 7,5 bei 37°C und einer Inkubationsdauer von 30 min getestet.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Inhibitorische Wirkung des Peptids cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21–30</sub>

**Fig. 1** zeigt die inhibitorische Wirkung des Peptids cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21–30</sub> im Vergleich zu dem ausschließlich aus L-Aminosäuren bestehenden zyklischen Peptid cyclo[21,29][Cys<sup>21,29</sup>]uPA<sub>21–30</sub>. Der IC<sub>50</sub>-Wert des zyklischen Peptids mit D-Cys an Position 21 wurde mit 78 nM bestimmt, während der IC<sub>50</sub>-Wert des nur aus L-Aminosäuren zusammengesetzten zyklischen Peptids mit 2260 nM bestimmt wurde. Der IC<sub>50</sub>-Wert des aminoterminalen Fragments von uPA (Aminosäuren 1 bis 135 von uPA) liegt im Vergleich dazu bei 21 nM.

### 2.2 Synthese von modifizierten uPA Peptiden

Unter Verwendung von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21–30</sub> als Leitstruktur wurden weitere zyklische Peptide hergestellt, in denen bestimmte Aminosäuren durch andere, insbesondere nicht-proteinogene Aminosäuren substituiert wurden. Die relative Aktivität im Vergleich zur Leitstruktur ist in **Fig. 2** gezeigt.

**Fig. 3** zeigt Beispiele für besonders bevorzugte Modifikationen der Leitstruktur.

### 2.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von Peptiden in humanem Serum und Vollblut

Es wurde die Stabilität der Peptide cyclo[19,31]-uPA<sub>16–32</sub> (A), cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Tic<sup>25</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21–30</sub> (B) und cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]uPA<sub>21–30</sub> (C) in Humanserum und heparinisiertem Humanblut getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in **Fig. 4a** und **4b** gezeigt. Die Peaks bei 20,5 min entsprechen dem Peptid A, die Peaks bei 23,0 min entsprechen dem Peptid B und die Peaks bei 24,9 min entsprechen dem Peptid C.

Zur Untersuchung der Stabilität der Peptide in humanem Serum (Fig. 4a) wurde ein Gemisch von jeweils 12,5 µg der Peptide zu rund 250 µl Serum gegeben. 100 µl davon wurden mit PBS auf 1 ml verdünnt, auf einer HLB-Vorsäule vorgereinigt und sofort durch HPLC analysiert (mittleres Profil). Weitere 100 µl wurden nach 20,5 h Inkubation bei 37°C (unteres Profil) analysiert. Als Kontrolle wurden jeweils 5 µg der Peptide mit 1 ml PBS versetzt und analysiert (oberes Profil). Der Peak bei 21,2 min entspricht einem nicht identifizierten Metaboliten.

Zur Untersuchung der Stabilität in heparinisiertem Humanblut (Fig. 4b) wurden 37,5 µg der Peptide mit 750 µl frisch präpariertem heparinisiertem Humanblut versetzt. 375 µl wurden sofort danach abzentrifugiert. 100 µl des Plasmaüberstands wurden analysiert (mittleres Profil). Die restlichen 375 µl wurden für 20,5 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend analysiert (unteres Profil). Als Kontrolle wurden bereits 5 µg der Peptide mit 1 ml PBS versetzt und analysiert (oberes Profil).

Nach 20,5 h Inkubation in humanem Serum bei 37°C konnte das Peptid A (cyclo[19,31]-uPA<sub>16-32</sub>) nicht mehr nachgewiesen werden. Statt dessen erschien ein neuer Peak mit relativ verlängerter Retentionszeit (Abb. 4a unterstes HPLC-Profil, RT 21,233 min), der vermutlich einem Metaboliten von A entspricht. Die relativen Retentionszeiten und Peak-Integrale der Peptide B (cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Tic<sup>25</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>) und C (cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>) blieben dagegen nach Exposition gegen Humanserum annähernd gleich. Daraus kann auf eine unveränderte chemische Identität und Konzentration der beiden Peptide nach 20,5stündiger Exposition gegen Humanserum geschlossen werden.

Auch die Exposition der Peptide gegen frisch isoliertes heparinisiertes Vollblut über 20,5 h zeigte die Instabilität von A. In diesem Fall konnte weder die unveränderte Substanz noch ein vermuteter Metabolit detektiert werden. Demgegenüber erschienen die Peaks der Peptide B und C im Humanblut stabil. Der Peak von A erscheint im Vergleich mit der PBS-Kontrolle bereits in der unmittelbar nach Zugabe zum Vollblut aufgearbeiteten und analysierten Probe wesentlich reduziert. Offenbar genügt die kurze Zeitspanne zwischen Zugabe der Peptide und Vorreinigung auf Vorsäulen (10–15 min) aus, einen wesentlichen Teil der zugefügten Peptidmenge (> 80%) abzubauen.

Die Peak-Integrale der beiden D-Cys-Derivate B und C aus Plasma sind deutlich größer als in der PBS-Kontrolle, obwohl sie bezogen auf die Gesamtvolumina von PBS und Vollblut in gleicher Konzentration eingesetzt wurden. Nach Inkubation wurden die Peptide aber nur im Plasma nach Entfernung der Blutkörperchen analysiert. Dies kann als Hinweis gewertet werden, daß die D-Cys-Derivate sich vorwiegend im Plasma verteilen, aber nicht signifikant in Blutzellen eindringen können bzw. binden können.

#### 2.4 Stabilität von uPA-Peptiden gegen Plasmin

Geprüft auf die Empfindlichkeit gegen Angriff durch die Gewebeprotease Plasmin wurden die Peptidleitstruktur cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> und deren Modifikationen an der Position 23 cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Orn<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (Ornithin), cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Dab<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (2,4-Diaminobuttersäure), cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Dap<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (2,3-Diaminopropionsäure), cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Nle<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (Norleucin) und cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Arg<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (Arginin). Die Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> enthält die aus Urokinase bekannte Plasminspaltstelle, nämlich die Peptidbindung zwischen Lys<sup>23</sup> und Tyr<sup>24</sup>.

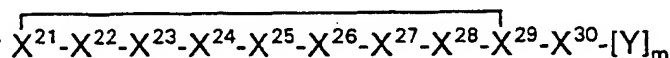
Fig. 5 zeigt HPLC-Profile von Peptidvarianten vor (obere Profile) und nach (untere Profile) Inkubation mit Plasmin. Teilabbildung (A) zeigt die unveränderte Leitstruktur cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> mit Lysin an Position 23, (B) die Ornithin-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Orn<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, (C) die Diaminobuttersäure-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Dab<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, (D) die Diaminopropionsäure-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Dap<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, (E) die Norleucin-substituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Nle<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> und (F) die Argininsubstituierte Variante cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Arg<sup>23</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>. Die Protease Plasmin erscheint in den unteren Profilen jeweils bei ca. 17,5 min.

Nach Inkubation von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> mit Plasmin und HPLC-Analyse der Produkte trat neben dem Peak der unveränderten Leitstruktur ein neuer, unbekannter Peak auf. Die Summe beider Peak-Integrale entsprach 93,5% des Peak-Integrals der unveränderten Leitstruktur. Bei dem neuen Peak handelte es sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Plasmin-Spaltprodukt von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>. Von den an Position 23 modifizierten Peptiden, die alle in Bezug auf die Konkurrenz mit uPA um die Bindung an den uPAR aktiv waren, erwiesen sich die Diaminobuttersäure-, Ornithin- und Norleucinsubstituierten als stabil gegen Plasmin (Fig. 5). Bei der Arg<sup>23</sup>-substituierten Variante trat nach Inkubation mit Plasmin ein neuer Peak auf, dessen Retentionszeit mit derjenigen des Plasmin-metaboliten der unveränderten Leitstruktur annähernd identisch war, d. h. die Arg<sup>23</sup>-substituierte Variante ist Plasmin-sensibel. Bei der Plasmin-Exposition der Diaminopropionsäuresubstituierten Variante traten zwei kleine unidentifizierte Peaks bei ca. 21 min auf. Deren Retentionszeit unterscheidet sich stark von den Retentionszeiten der Plasmin-Metaboliten der Leitstruktur und derjenigen der Arg<sup>23</sup>-Variante. Entsprechend fraglich ist, ob die kleinen 21 min-Peaks tatsächlich spezifische Plasminspaltprodukte der Dap<sup>23</sup>-Variante darstellen.

Durch Substitution von Lysin an Position 23 der cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> Leitstruktur durch nicht-proteinogene Aminosäuren kann Stabilität gegen die Gewebeprotease Plasmin erzeugt werden, ohne die biologische Aktivität wesentlich zu verändern.

#### Patentansprüche

##### 1. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin X<sup>21</sup>-X<sup>30</sup> monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung X<sup>21</sup> = D-Cys, X<sup>22</sup> = Asn, X<sup>23</sup> = Lys, X<sup>24</sup> = Tyr, X<sup>25</sup> = Phe, X<sup>26</sup> = Ser, X<sup>27</sup> = Asn, X<sup>28</sup> = Ile, X<sup>29</sup> = Cys

und  $X^{30}$  = Trp abgeleitet sind,

Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, ist mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur durch

einen der im folgenden angegebenen Aminosäurereste ersetzt ist:

$X^{21}$ : Asp, Glu, 2,3-Diaminopropionsäure (Dap), 2,4-Diaminobuttersäure (Dab), Penicillamin (Pen), D-Pen, Allyl-glycin (Alg), Ornithin (Orn), Lys;

$X^{22}$ : Gln, Asp, Glu;

$X^{23}$ : Orn, Dap, Arg, His, Citrullin (Cit), Homocitrullin (Hci), Norleucin (Nle);

Phe, Homophenylalanin (Hph), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic), Thienylalanin (Thi), Trp, Phenylglycin (Phg), 1-Naphthylalanin (1-Nal), 2-Naphthylalanin (2-Nal) Cha (Cyclohexylalanin);

$X^{25}$ : Tyr, Trp, Tic, Thi, Hph, Phg;

$X^{26}$ : Thr, Val, Homoserin (Hse);

$X^{27}$ : Gln, Asp, Glu;

$X^{28}$ : Val, Leu, 2-Aminobuttersäure (Abu), tert.-Leucin (Tle), Norvalin (Nva), Nle,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib);

$X^{29}$ : Asp, Glu, Dap, Dab, Alg, Pen, D-Pen, Orn, Lys;

$X^{30}$ : Thi, Phe, Tyr, 2-Nal, 1-Nal, Octahydroindolyl-2-carbonsäure (Oic), His, Thiazolylalanin (Thia), Phg, Trypta-min.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

$X^{21}$ : D-Pen;

$X^{22}$ : Gln;

$X^{23}$ : Orn, Dap, Dab, Arg, Cit, Hci, Nle, His;

$X^{24}$ : Phe, Thi, Hph, Phg, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

$X^{25}$ : Thi;

$X^{27}$ : Asp;

$X^{28}$ : Nle, Val, Cha;

$X^{29}$ : Pen;

$X^{30}$ : Phe, Thi, Tyr, Oic, 1-Nal, Hph, Thia.

3. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur eine der im folgenden angegebenen Bedeutungen besitzt:

$X^{21}$ : D-Pen;

$X^{23}$ : Arg, Nle, Cit, Hci;

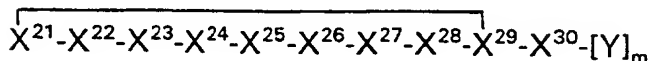
$X^{24}$ : Phe, 1-Nal, 2-Nal, Cha;

$X^{25}$ : Thi;

$X^{28}$ : Nle, Cha;

$X^{29}$ : Pen.

4. Verbindungen der allgemeinen Strukturformel (I):



worin  $X^{21}$   $X^{30}$  monomere Bausteine, vorzugsweise Aminocarbonsäurereste bedeuten und von einer Struktur mit der Bedeutung  $X^{21}$  = D-Cys,  $X^{22}$  = Asn,  $X^{23}$  = Lys,  $X^{24}$  = Tyr,  $X^{25}$  = Phe,  $X^{26}$  = Ser,  $X^{27}$  = Asn,  $X^{28}$  = Ile,  $X^{29}$  = Cys und  $X^{30}$  = Trp abgeleitet sind. Y ein Spacer ist und m 0 oder 1, und die monomeren Bausteine über -CONR<sup>1</sup>- oder -NR<sup>1</sup>CO-Bindungen verknüpft sind, wobei R<sup>1</sup> jeweils unabhängig Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, und pharmazeutisch verträgliche Salze und Derivate davon, ist mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Aminosäurereste  $X^{21}$ - $X^{30}$  der Leitstruktur durch einen nicht-proteinogenen Aminosäurerest ersetzt ist.

5. Verbindungen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine erhöhte Proteasestabilität im Vergleich zur Leitstruktur aufweisen.

6. Verbindungen nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß Lys<sup>23</sup> durch eine nicht-proteinogene Aminosäure ersetzt ist.

7. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 2 der Aminosäurereste  $X^{22}$ ,  $X^{23}$ ,  $X^{24}$ ,  $X^{25}$ ,  $X^{26}$ ,  $X^{27}$ ,  $X^{28}$  und  $X^{30}$  eine gleiche Seitenkette wie eine Aminosäure an gleicher Position in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.

8. Verbindungen nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 2 der Aminosäurereste  $X^{24}$ ,  $X^{25}$ ,  $X^{28}$  und  $X^{30}$  die gleiche Seitenkette wie in der nativen uPA-Sequenz aufweisen.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder Verdünnungsmitteln enthält.

10. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1-8, zur Herstellung eines uPAR-Antagonisten.

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Bekämpfung von mit der Expression von uPAR assoziierten Krankheiten, insbesondere zur Tumorbekämpfung.

12. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, zur Herstellung eines Targetingvehikels für uPAR-exprimierende Zellen.

- Leerseite -

Abbildung 1

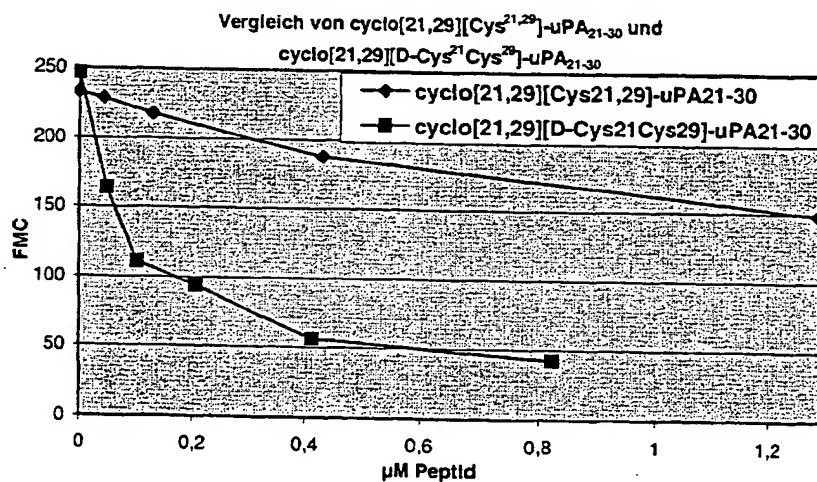


Abbildung 2

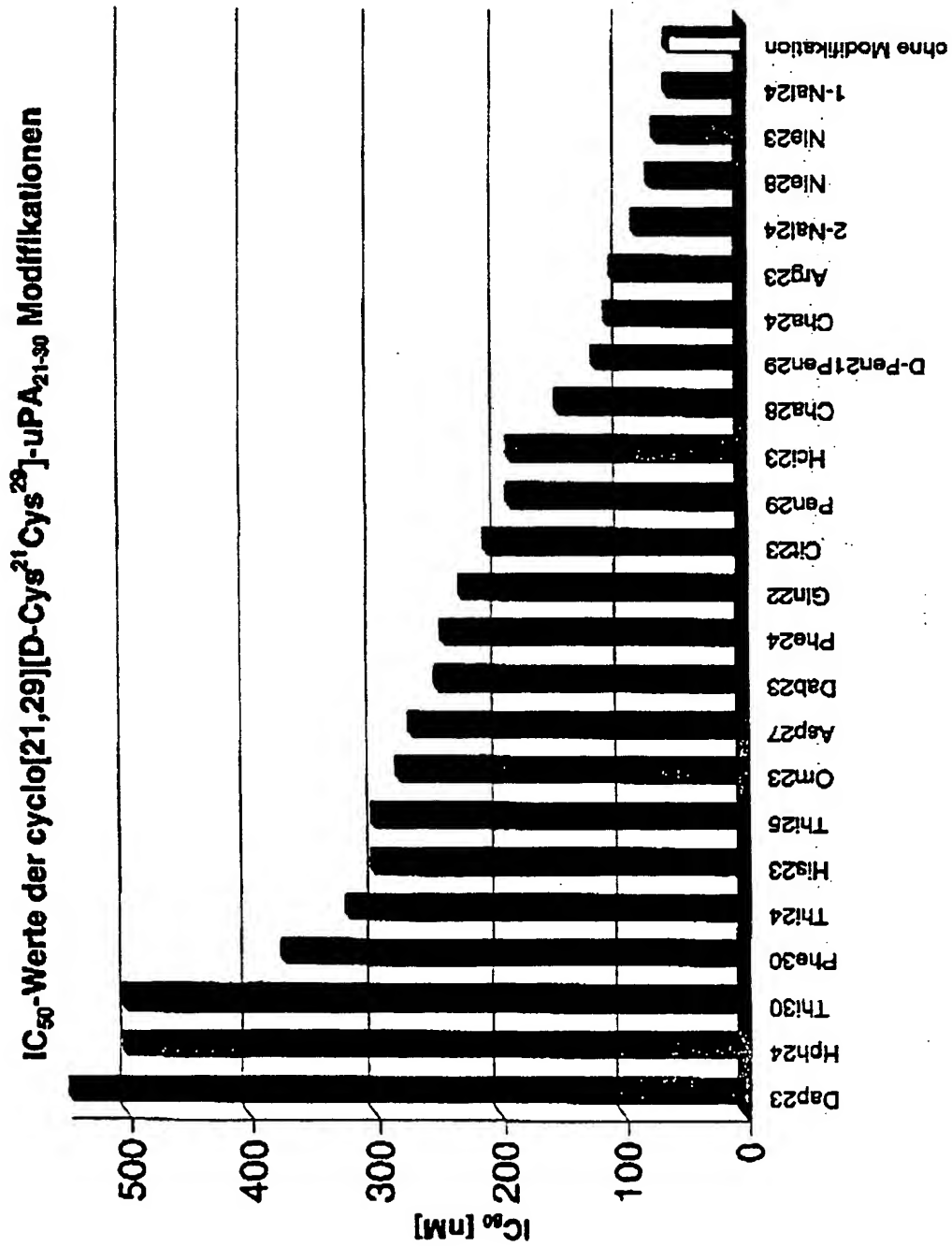


Abbildung 3

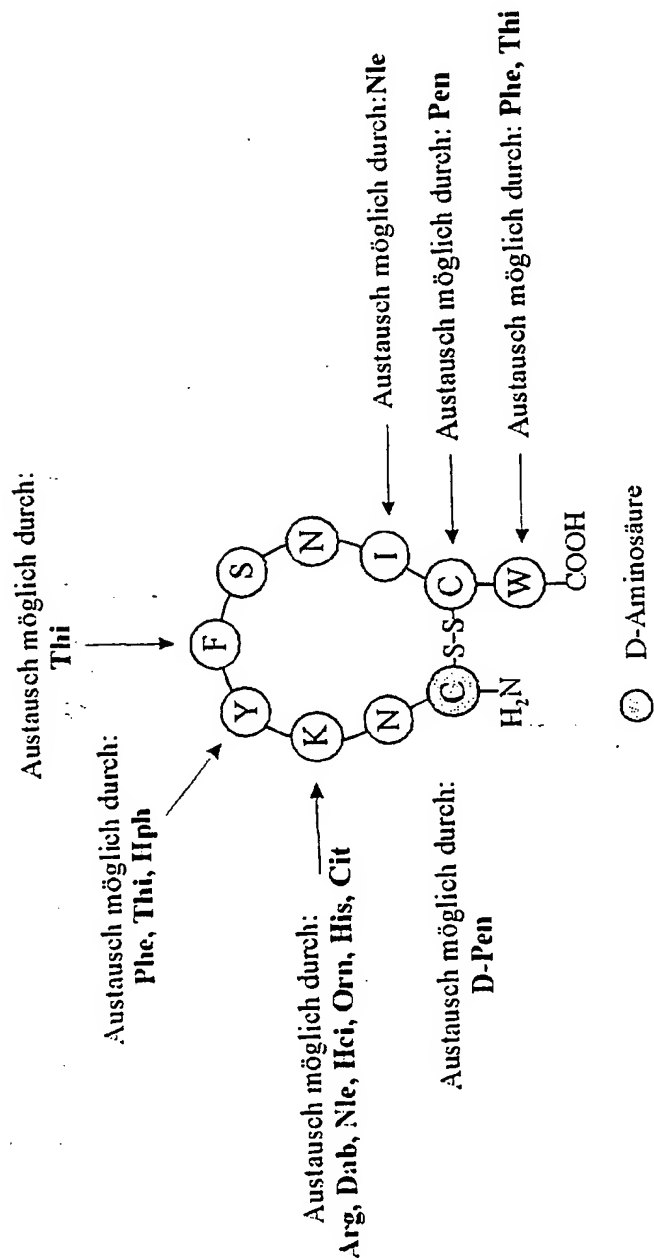


Abbildung 4a

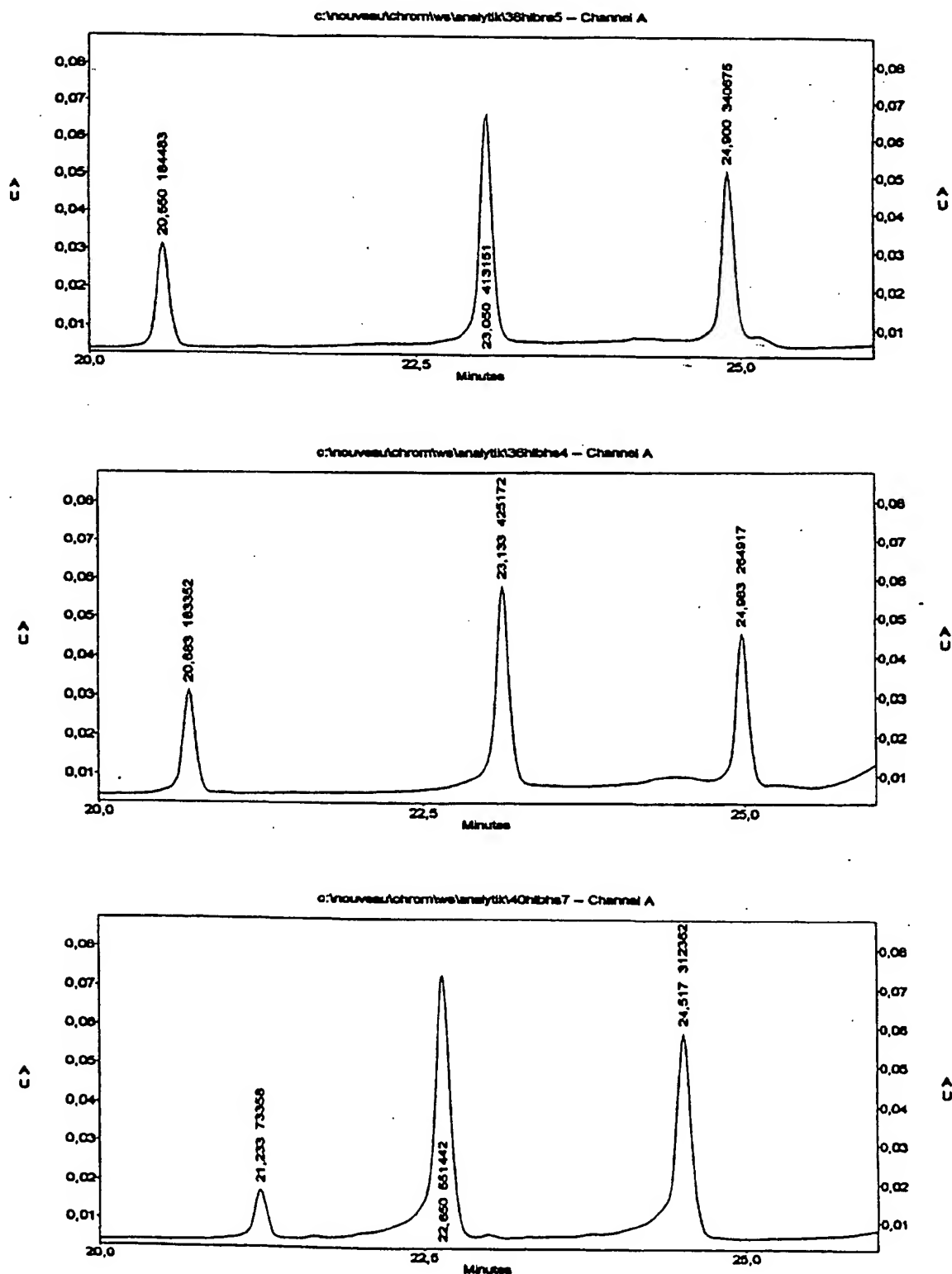




Abbildung 4b

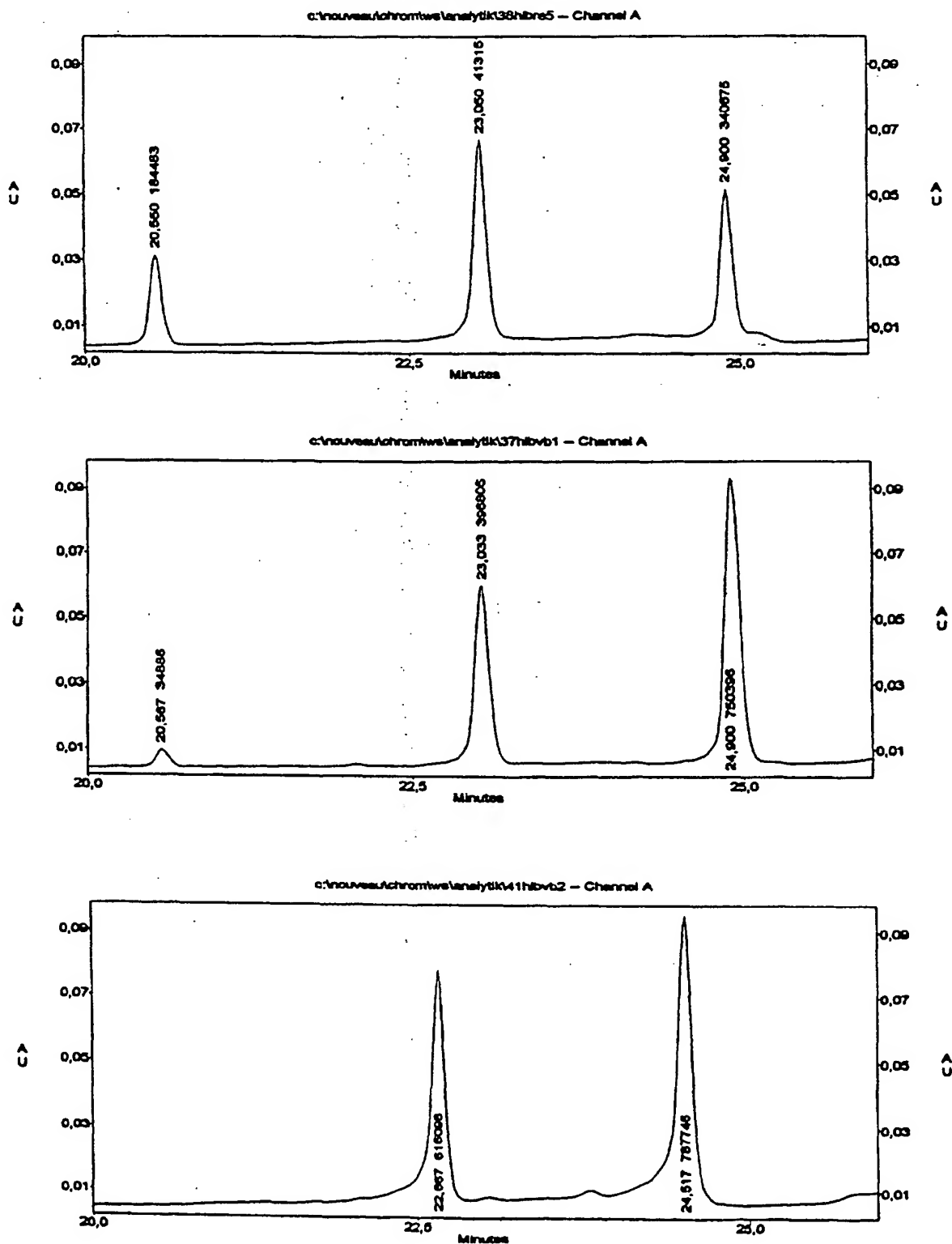
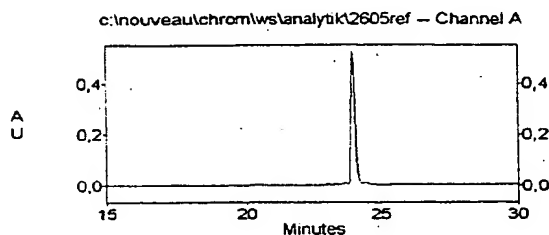
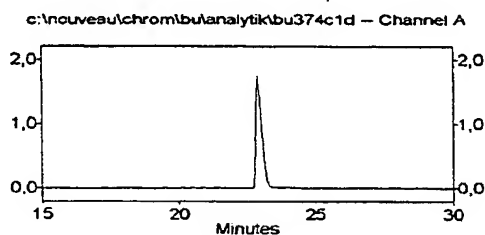
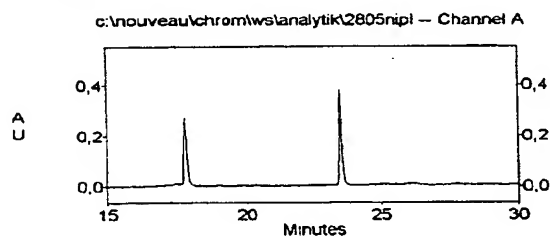


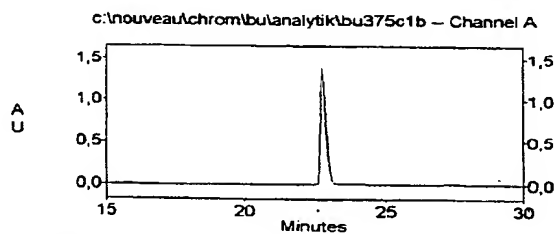
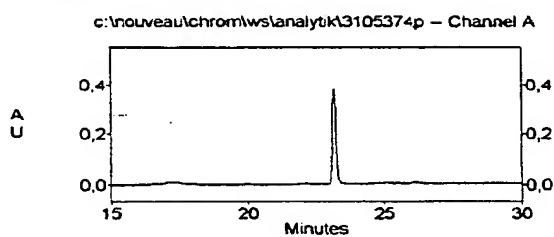
Abbildung 5



A



B



C

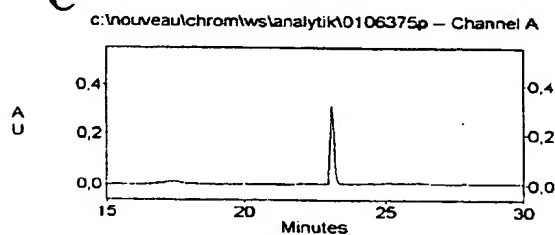
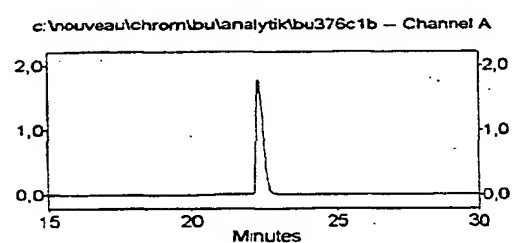
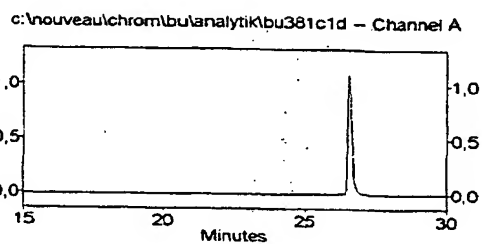
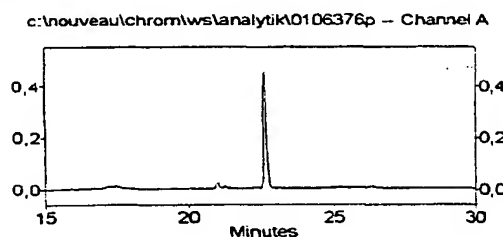


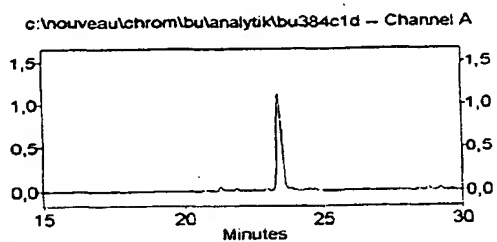
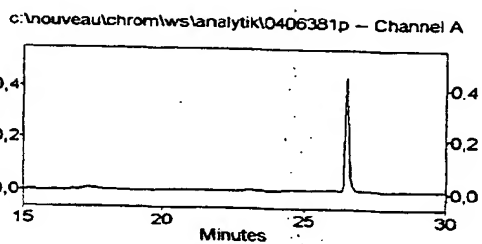
Abbildung 5  
 (Fortsetzung)



D



E



F

